

19



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



11 Veröffentlichungsnummer: **0 525 502 A1**

12

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: **92111947.5**

51 Int. Cl.5: **A61K 39/395, A61L 2/00,  
C07K 3/28**

22 Anmeldetag: **14.07.92**

30 Priorität: **02.08.91 DE 4125625**

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**03.02.93 Patentblatt 93/05**

64 Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI NL SE**

71 Anmelder: **OCTAPHARMA AG**  
**Schwelzerhofstrasse 1**  
**CH-8750 Glarus(CH)**

72 Erfinder: **Gehringer, Werner**  
**Speckbachergasse 35/8**  
**A-1160 Wien(AT)**  
Erfinder: **Selosse, Patrick**  
**13/11, Rue des Portes de Cauderan**  
**F-33200 Bordeaux(FR)**

74 Vertreter: **Werner, Hans-Karsten, Dr. et al**  
**Deichmannhaus am Hauptbahnhof**  
**W-5000 Köln 1(DE)**

54 Verfahren zur Herstellung von virusinaktivierten Immunglobulinlösungen.

57 Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von zur intravenösen Applikation geeigneten virusinaktivierten Immunglobulinlösungen, dadurch gekennzeichnet, daß das Immunglobulin mit nichtionischen Tensiden behandelt wird, die anschließend durch Festphasenextraktion an hydrophoben Materialien entfernt werden.

EP 0 525 502 A1

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung virusinaktivierter Immunglobulinlösungen, die zur intravenösen Injektion geeignet sind.

Immunglobuline sind humorale Glykoproteine, die bei der Elektrophorese der Plasma- bzw. Serumproteine in der sogenannten Gamma-Fraktion wandern und daher früher als Gamma-Globuline bezeichnet wurden.

Immunglobuline werden wegen ihres hohen Gehalts an Antikörpern zur Prophylaxe und Therapie von Infektionen verwendet.

Es ist bekannt, Immunglobuline sowohl für die intramuskuläre als auch subkutane Applikation herzustellen. Eine vielfach angewendete Herstellungsmethode ist die sogenannte Cohn-Oncley-Fraktionierung, auch 6/9-Methode genannt (Cohn et al., J. Am. Chem. Soc. 68, 459 (1946); Oncley et al.; J. Am. Chem. Soc. 71, 541 (1949).

Dieses Herstellungsverfahren hat jedoch den Nachteil, daß es zu einer hochviskosen Lösung, die nur intramuskulär oder subkutan applizierbar ist, mit hohen Antikörperkonzentrationen in relativ geringen Volumina führt. Das erhaltene Produkt ist zwar bei 4°C stabil, es kann jedoch Proteolyse durch Plasminverunreinigungen auftreten. Weiterhin können IgA- und IgG-Dimere vorhanden sein, die bei der Applikation zu einer anaphylaktischen Reaktion der Patienten führen können (Ullmann, Enzyklopädie of Industrial Chemistry, 1989, A14, Seiten 93, 94).

Aus diesem Grunde sind intravenös applizierbare Immunglobuline entwickelt worden, die beim Patienten eine bessere Verträglichkeit zeigen. Diese werden aus der sogenannten Fraktion 3 oder auch Cohn-Fraktion 2 (Cohn et al. a. a. O.) bei pH4 unter Verwendung von Polyethylenglycol, einer anschließenden Ethanol-fällung, Ultra- oder Diafiltration und Ionenaustauscherchromatographie hergestellt. Das auf diese Art erhaltene Immunglobulin wird mit Mono- oder Disacchariden stabilisiert.

Ein solches verbessertes Verfahren wird in der EP 0 073 371 beschrieben.

Ausgehend von der Fraktion 3 (Cohn et al. a. a. O.) wird nach Lösen und Einstellung des pH-Wertes auf pH4 eine Ultrafiltration und eine Diafiltration vorgenommen. Anschließend wird das erhaltene Filtrat zu einem Proteingehalt von 5 Gew.-% konzentriert und der Alkoholgehalt auf 8 Gew.-% reduziert. Nachdem die so erhaltene Immunglobulinlösung auf einen Proteingehalt von 8% aufkonzentriert ist, erhält man eine klare wasserartige Lösung mit einer Ionenstärke von 0,01 und einem pH-Wert von 4,2. Die Tonizität der Lösung wird mit 10 Gew.-% Maltose bei einem Proteingehalt von 5 Gew.-% eingestellt. Anschließend wird sterilfiltriert und lyophilisiert. Das lyophilisierte Material wird vor der Injektion in geeigneten Medien gelöst.

Ein großer Nachteil der so hergestellten Im-

mungglobuline zur intravenösen Anwendung ist, daß sie vor Gebrauch erst in geeigneten Medien gelöst werden müssen und nur in lyophilisierter Form lagerfähig sind.

Ein weiterer Nachteil liegt darin, daß bei Anwendung dieser Immunglobuline Viren auf den Patienten übertragen werden können, da während des Herstellungsverfahrens keine Virusinaktivierung stattfindet. So wurde nach intravenöser Immunglobulingabe über Hepatitis-Erkrankungen und HIV-Infektionen berichtet (Ullmanns Encycl. of Ind. Chem., Vol. A14, 1989, pages 102, 103).

Das technische Problem der Erfindung war es daher, ein Verfahren zur Virusaktivierung von intravenös injizierbaren Immunglobulinen zu entwickeln, das zu einem Produkt führt, bei dessen Applikation keine Virusübertragungen auf den Patienten auftreten und welches so stabil ist, daß es selbst ohne Lyophilisierung direkt als Injektionslösung hergestellt und gelagert werden kann.

Das technische Problem der Erfindung wird durch ein Verfahren gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, daß das Immunglobulin mit nichtionischen Tensiden behandelt wird, die anschließend durch Festphasenextraktion an hydrophoben Materialien entfernt werden.

Als nichtionische Tenside werden insbesondere TNBP und/oder Triton X 100 verwendet. Der pH-Wert der Lösung beträgt vorzugsweise 5,0 bis 5,5.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird nach der Behandlung mit nichtionischen Tensiden mit biologisch kompatiblen Pflanzenölen extrahiert und diese dann abgetrennt. Als Pflanzenöle werden bevorzugt Rizinusöl oder Sojaöle verwendet.

Die anschließende Festphasenextraktion erfolgt in bevorzugter Weise mit octadecylderivatisierten Stoffen, die auch für die Umkehrphasenchromatographie verwendet werden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Festphasenextraktion durch eine Umkehrphasenchromatographie an Octadecyl-(C-18)-Harz.

Dem fertigen Produkt kann nach der Festphasenextraktion ein Disaccharid zur Stabilisierung zugegeben werden. Die fertige Lösung wird dann ein oder mehrmals sterilfiltriert.

Weiterhin kann die Immuglobulinlösung vor der Virusaktivierung und/oder nach der Sterilfiltration einer Ultra- und Diafiltration unterzogen werden.

Im folgenden wird das erfindungsgemäße Herstellungsverfahren im einzelnen beschrieben. Zunächst wird, wie aus dem Stand der Technik bekannt, die sogenannte Cohn-Fraktion II in Wasser gelöst, bis eine vollständige klare Lösung erhalten wird. Die Lösung wird dann auf einen pH-Wert von 4,0 bis 5,0, vorzugsweise 4,5, eingestellt und zur Entfernung von Verunreinigungen filtriert.

Anschließend wird mit der Lösung eine Ultrafiltration durchgeführt und die Lösung ankonzentriert.

Die Ausschlußgrenze der Ultrafiltration ist 30.000 Dalton. In diesem Schritt werden insbesondere Verunreinigungen mit niedrigen Molekulargewichten entfernt. Daran anschließend wird eine Diafiltration zur Entfernung von Ionen vorgenommen, woran

sich die eigentliche Virusinaktivierung anschließt. Hierzu wird die Lösung zunächst abgekühlt auf 4 bis 8 °C und der pH-Wert auf 5,0 bis 5,5, vorzugsweise 5,3, eingestellt. Es werden dann nichtionische Tenside, vorzugsweise TNBP und/oder Triton X 100, zugegeben und diese Lösung dann mehrere Stunden gerührt. Im Anschluß daran kann in einer bevorzugten Ausführungsform eine Pflanzenölextraktion vorgenommen werden. Hierbei werden der Lösung 5 Gew.-% Pflanzenöl zugegeben, die Lösung anschließend auf Raumtemperatur gebracht und mit dem Pflanzenöl verrührt. Der anschließenden Phasentrennung wird eine Filtration angeschlossen.

Die Lösung wird dann auf eine C 18-Säule gegeben und chromatographiert. Nach der Chromatographie erfolgt eine pH-Werteinstellung auf pH 4. Zur Einstellung der Tonizität wird Maltose zugegeben. Nach der anschließenden Sterilfiltration wird eine Stabilitätsprüfung in der so erhaltenen Lösung vorgenommen, indem diese mindestens 22 Stunden bei 37 °C aufbewahrt wird. Zeigt die Lösung Trübungen, ist sie nicht verwendbar. Zeigt die Lösung in dieser Zeit keine Trübung, wird der pH-Wert auf 5,0 bis 5,5, vorzugsweise 5,3, eingestellt, eine weitere Ultra- und Diafiltration vorgenommen und die so erhaltene Lösung nach Zugabe von Maltose auf einen Proteingehalt von 50 g/l eingestellt. Anschließend wird eine weitere Sterilfiltration vorgenommen und direkt in Infusionsflaschen abgefüllt.

Das so erhaltene Produkt kann direkt intravenös injiziert werden und ist frei von Viren.

Das folgende Ausführungsbeispiel soll das erfindungsgemäße Verfahren näher erläutern.

#### Ausführungsbeispiel

Die Cohn-Fraktion II wird mit der sechsfachen Menge Wasser gelöst und so lange gerührt, bis eine klare Lösung erhalten wird. Anschließend wird der pH-Wert mit 0,5 normaler HCl auf 4,5 eingestellt. Es schließt sich zunächst eine Ultrafiltration an, bei der die Lösung auf 90 g/l ankonzentriert wird. Als Membrantyp wird Novasette 30 K verwendet. Daran anschließend wird mit der fünffachen Menge Wasser verdünnt und bei 0,3 bis 0,5 bar eine Diafiltration vorgenommen. Nach dieser Diafiltration wird die diafiltrierte Lösung auf 70 g/l Proteingehalt eingestellt. Die Lösung wird auf 4 bis 8 °C abgekühlt und auf einen pH-Wert von 5,3 mittels 0,1 normaler Natronlauge eingestellt. Anschließend wird 0,3 Gew.-% TNBP und 1 Gew.-% Triton

X 100 in die Lösung gegeben und kräftig gerührt. Nach etwa 4 Stunden bei 4 bis 8 °C erfolgt eine weitere Zugabe von 5 Gew.-% Rizinusöl. Es wird dann eine Ölextraktion bei 15 °C vorgenommen. Die entstehenden Phasen werden getrennt und es wird anschließend mit einem Cuno-Schichtenfilter filtriert. Danach wird die Lösung auf eine C 18-Säule gegeben, die mit octadecylderivatisierten Stoffen beladen ist. Die Lösung wird dann auf pH 4 eingestellt und 100 g/l Maltose zugegeben. Nachfolgend wird eine Sterilfiltration vorgenommen und die sterilfiltrierte Lösung zwischen 22 und 24 Stunden bei 37 °C aufbewahrt. Die anschließend klare Lösung wird auf einen pH-Wert von 5,3 mittels 0,1 normaler Natronlauge eingestellt. Es erfolgt wiederum eine Ultra- und eine Diafiltration, danach eine Maltosezugabe von 100 g/l und die Einstellung der Lösung auf einen Proteingehalt von 50 g/l. Nach der folgenden Sterilfiltration wird die Lösung in 50 ml Infusionsflaschen, die sterilisiert und silikonisiert sind, abgefüllt, mit Stopfen verschlossen und verbördelt.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von zur intravenösen Applikation geeigneten virusinaktivierten Immunglobulinlösungen, dadurch gekennzeichnet, daß das Immunglobulin mit nichtionischen Tensiden behandelt wird, die anschließend durch Festphasenextraktion an hydrophoben Materialien entfernt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert der Lösung 5,0 bis 5,5 beträgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als nichtionische Tenside TNBP und/oder Triton X 100 verwendet werden.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß nach der Behandlung mit nichtionischen Tensiden mit biologisch kompatiblen Pflanzenölen extrahiert wird und diese dann abgetrennt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Pflanzenöle Rizinusöl und/oder Sojaöl verwendet werden.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Festphasenextraktion mit octadecylderivatisierten Stoffen, die auch für die Umkehrphasenchromatographie verwendet werden, durchgeführt wird.

7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Festphasenextraktion durch C 18 Umkehrphasenchromatographie erfolgt.

5

8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Lösung nach der Festphasenextraktion ein Disaccharid zugegeben wird.

10

9. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die fertige Lösung ein- oder mehrmals sterilfiltriert wird.

10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Immunglobulinlösung vor der Virusinaktivierung und/oder nach der Sterilfiltration einer Ultra- und Diafiltration unterzogen wird.

15

20

11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die nach der Festphasenextraktion oder der Disaccharidzugabe eine Stabilitätsprüfung der hergestellten Lösung vorgenommen wird.

25

30

35

40

45

50

55



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 92 11 1947

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
X	EP-A-0 366 946 (NEW YORK BLOOD CENTER) * das ganze Dokument *	1-3,6-11	A61K39/395 A61L2/00 C07K3/28
Y	---	4-5	
Y	EP-A-0 239 859 (NEW YORK BLOOD CENTER) * das ganze Dokument *	4-5	
A	---		
A	EP-A-0 322 786 (NEW YORK BLOOD CENTER) * das ganze Dokument *	1-11	
A	---		
A	EP-A-0 131 740 (NEW YORK BLOOD CENTER) * das ganze Dokument *	1-11	
	-----		
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 16 NOVEMBER 1992	Prüfer FERNANDEZ Y BRA F.
<b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</b> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			